12-11

Reporter Assay Kit
-βgal-

(Code No. BAK-101)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

ー　目次　ー

ページ

［１］はじめに　２

［２］本キットに含まれるもの　３

［３］プロトコール　４

・キットの他に必要なもの　４

・標準アッセイ方法　４

・簡便アッセイ法　５

・ポジコン溶液について　５

［４］トラブルシューティング　６

ご注意

本試薬は研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。また本試薬の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し，安全に留意してください。

［1］はじめに

遺伝子の発現調節において重要な働きをしているプロモーターやエンハンサー、あるいはそれらに結合する転写因子などの解析を行う方法として、従来よりレポーターアッセイが広く用いられています。Reporter Assay Kit *-βgal-* は、従来よりレポーターとして広く用いられているβ-ガラクトシダーゼ(β-gal)を検出するためのキットです。β-galレポーターアッセイでは、大腸菌*LacZ* 遺伝子にコードされているβ-gal(至適pH7.3)を用いることにより、ほとんどの動物細胞が持つ内在性のβ-gal(至適pH5以下)とは、至適pHの差を利用して選択的に活性を測定することができます。従来のβ-galレポーターアッセイではONPGを用いた呈色反応によりその転写活性を見ていましたが、あまり感度が高くないため、一般的には他のレポーターアッセイの内部コントロールとして用いられる程度にすぎませんでした。しかし本キットでは、近年開発された化学発光基質を用いることにより呈色反応での欠点を克服し、高感度で測定レンジの広いアッセイを行うことができるようになりました。本キットは以下のような特長をもっています。

- 高感度な化学発光基質を用いており、また広範なレンジ(5桁以上)で測定可能です。
- 高pH域(pH＞9)でアッセイを行うことにより、内在性のβ-gal活性(バックグランド)を最小限に抑えられます。
- キットに細胞溶解バッファーが含まれているため、特別な試薬調製が不要です。
- サンプル調製（細胞溶解操作）が容易です（注１）。
- 付属の細胞溶解バッファーは、他のレポーターアッセイ(ルシフェラーゼアッセイ等)にも使用可能です（注２）。

（注１）本キットの細胞溶解バッファーを用いると、ほとんどの接着細胞(MDCK細胞やヒトケラチノサイトのような一般に細胞膜が堅固であるとされる上皮細胞もこの中に含まれる)では凍結融解や激しい攪拌を行わなくても細胞溶解・サンプル調製を行うことが可能ですが、浮遊細胞やごく一部の接着細胞では、細胞溶解に凍結融解や攪拌操作が必要となる場合があります。また通常の接着細胞を用いる場合でも、これらの操作を行うことにより若干の感度アップが可能です。

（注２）本キットの細胞溶解バッファーを用いてルシフェラーゼアッセイを行うと、他の多くのキットに付属の細胞溶解用バッファーを用いた場合に比較して、試薬を混合してから発光のシグナルがピークに達するまでの時間が長くなる傾向があります。これにより、分注機能の無い測定装置を用いてもルシフェラーゼアッセイが行いやすくなっています。

参考文献

* J.Alam and J.L.Cook (1990) Analytical Biochemistry **188** 245-254
* E.G.Beale, E.A.Deeb, R.S.Handley, H.Akhavan-Tafti and A.P.Schaap (1992) Biotechniques **12** 320-323
* 西郷 薫, 佐野 弓子共訳 (1997) CURRENT PROTOCOLSコンパクト版　分子生物学実験プロトコールⅡ 288-298
* D.C.Young, S.D.Kingsley, K.A.Ryan and F.J.Dutjo (1993) Analytical Biochemistry **215** 24-30

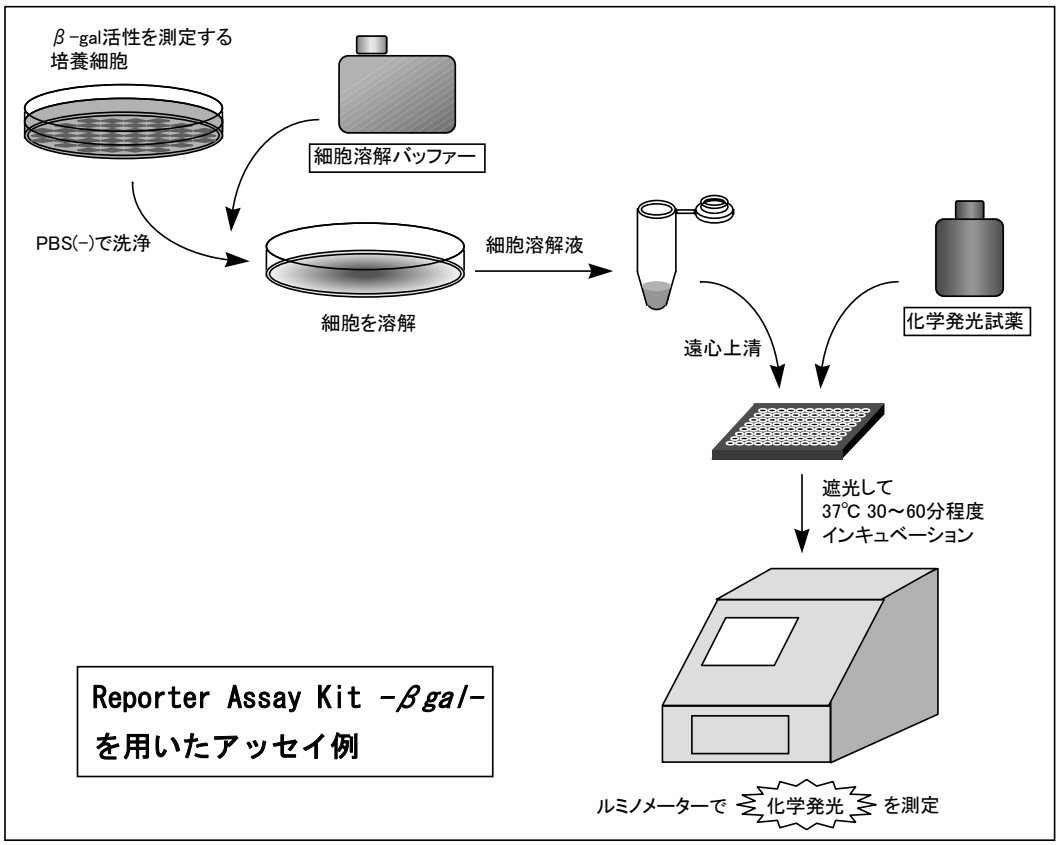
［2］キットに含まれるもの

- **化学発光試薬 (Lumi-Gal® 530)：100 ml**
- **細胞溶解バッファー:　　150 ml**
- **ポジコン溶液:　　0.1 ml**

＊ Lumi-Gal®は Lumigen, Inc.の登録商標です。

- **化学発光試薬(Lumi-Gal® 530)は-20℃保存品ですが、出荷時には4℃で管理されています。<u>キットがお手元に届いたら、できるだけ早く-20℃フリーザーへ移して保存してください。</u>**この時、遮光できる容器に少量ずつ分注して保存しておくと、ご使用の際に必要量だけを融解して使用することができるので便利です。なお、化学発光試薬の凍結融解は10回以内にとどめてください。また、融解した試薬は4℃で2週間は安定です。

- 化学発光試薬及び細胞溶解バッファーには、有機溶剤や界面活性剤が含まれています。ご使用の際には手袋等の保護具を着用し、安全に注意して取り扱ってください。**<u>万一、目に入った場合には、きれいな水で十分に洗い流した後、医師の診察を受けてください。</u>**



［3］プロトコール

キットの他に必要なもの

・PBS(-)
・発光を測定、検出する機器・器具
（ルミノメーター、X線フィルムなど）
・反応混合液を入れて測定を行う容器
（測定機器に対応した96ウェルマイクロプレート、セルなど）
・1.5mlマイクロチューブ

標準アッセイ方法

（96ウェルマイクロプレート対応型ルミノメーターを用いる場合）

Step 1.　化学発光試薬(Lumi-Gal® 530)を氷上で融解します。

Step 2.　β-gal活性を測定する培養細胞(サンプル)から培地を除去します。

Step 3.　PBS(-)を加えて1回リンスし、PBS(-)を完全に除去します。

Step 4.　適当量の細胞溶解バッファーを加え、容器を傾けるなどしてバッファーを細胞全体に行き渡らせます。

・φ35mmシャーレの場合は、200～250μl程度の細胞溶解バッファーが適量です。

Step 5.　氷上で5～10分間静置します。

・次の操作の前に、液体窒素(あるいはドライアイス／エタノールバス)と37℃恒温槽を用いて1～3回程度の凍結融解を行うと、若干の感度アップが可能です。

Step 6.　ピペッティング等により細胞を懸濁・溶解します。

・面積の広い培養容器を用いる場合は、ラバーポリスマンで細胞をかき集めた後、1.5mlマイクロチューブに移してボルテックスして、懸濁・溶解するとよいです。

Step 7.　細胞溶解液を1.5mlマイクロチューブに移し、4℃、15,000rpmで2分間遠心します。

Step 8.　上清20μlを測定用の96ウェルマイクロプレートに移します。

・細胞溶解後のサンプルをすぐにアッセイしない場合は、-20℃で凍結保存しておけば1ヶ月程度は活性の大きな低下は見られません。また、凍結融解の繰り返しについても、2,3回程度ならば活性にはあまり影響しません。

Step 9.　180μlの化学発光試薬(Lumi-Gal® 530)を加え、よく混合します。

Step 10.　遮光して37℃で30～60分間インキュベーションします。

・発光のシグナルがピークに達するまでの時間は、サンプル中のβ-gal活性の大きさにより15～90分以上と変動しますが、インキュベーション時間30分前後が最も直線性が高いことが実験で確かめられています。

Step 11.　ルミノメーターで5～10秒間程度の発光量を測定します。

・遠心チューブや試験管を用いて溶液の混合を行う場合は、サンプル(細胞溶解液上清)及び化学発光試薬の量を1.5倍に増やしてアッセイを行ってください。

簡便アッセイ法

マイクロプレートを用いるスクリーニングのように、多サンプルを高速に処理する必要がある場合は、サンプル調製を簡略化した次のような方法でアッセイを行うことができます。ただし、感度及び定量性の点では前ページの方法より劣ります。ここでは、細胞培養・β-galアッセイ共に96ウェルマイクロプレートを用いる場合を紹介します。

Step 1.　化学発光試薬(Lumi-Gal® 530)を氷上で融解します。

Step 2.　β-galを発現している培養細胞(サンプル)から培地をできるだけ完全に除去します。

Step 3.　50μlの細胞溶解バッファーを加えます。

Step 5.　プレートミキサーで5～10分間攪拌します。

・ 攪拌操作が困難な場合は10～15分間程度静置してください。

Step 6.　上清20μlを測定用のマイクロプレートに移します。

Step 7.　180μlの化学発光試薬(Lumi-Gal® 530)を加え、よく混合します。

Step 8.　遮光して37℃で30分間インキュベーションします。

Step 9.　ルミノメーターで5～10秒間程度の発光量を測定します。

ポジコン溶液について

ポジコン溶液を用いることにより、アッセイ系が正常に働いていることを確認することができます。この溶液には、大腸菌由来のβ-galactosidaseが含まれています。

・ポジコン溶液の使い方

サンプルの代わりに1～2μlのポジコン溶液（あるいはその1/10希釈液1～20μl）を用います。

・ご注意

ポジコン溶液はアッセイ系のポジティブコントロールとしてのみ使用し、サンプル中のβ-gal活性の指標としては用いないでください。

［4］トラブルシューティング

トラブル	考えられる原因	コメント
シグナルが弱い、あるいは全く検出できない	培養細胞へのDNAの導入量が少ない	培養細胞へのトランスフェクションの条件を至適化してください。
	ベクターの問題	プロモーターやエンハンサーが正常に機能していない場合が考えられます。
	細胞溶解が不十分	本キットの細胞溶解バッファーを用いると、ほとんどの接着細胞では凍結融解や激しい攪拌を行わなくても細胞溶解・サンプル調製を行うことが可能ですが、浮遊細胞やごく一部の接着細胞では、細胞溶解に凍結融解や攪拌操作が必要となる場合があります。
	β-galの失活	β-gal活性の低下を防ぐため、サンプルはできるだけ氷上に置くようにしてください。
	β-galが極度に高い	β-gal活性が極度に高い場合、化学発光試薬を混合してから短時間のうちに発光シグナルがピークに達し、その後急速に減衰することがあります。このような場合は、測定サンプルを細胞溶解バッファーで希釈してください。
	化学発光試薬の量が適正でない	化学発光試薬の添加量が正しいか確認してください。
	測定機器・装置の故障	測定機器・装置に問題がないか確認してください。
シグナルが強すぎる	サンプル中のβ-gal活性が高すぎる	測定サンプル(細胞の溶解液)を細胞溶解バッファーで適当に希釈するか、あるいは検出時間を短縮してください。
バックグランドが高い	内在性のβ-gal活性の影響	用いる細胞種によっては内在性のβ-gal活性が高く、バックグランドに現れる可能性があります。この場合は、サンプル(細胞溶解液上清)を50℃、30分間の加熱処理を行うことにより、内在性のβ-gal活性を抑えることができます。

【製造・販売元】

－納期・注文に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部（大阪)
〒530-8230　大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部（東京)
〒141-8633　東京都品川区東五反田二丁目 10 番 2 号　東五反田スクエア
TEL 03-6422-4819　FAX 03-6422-4951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間　9:00～12:00 , 13:00～17:00　(土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］http://www.toyobo.co.jp/bio